FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N° C

Action du Lysozyme et de Protéines à caractère basique sur la coagulation la vitesse de sédimentation, l'hémagglutination

THESE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Marseille

le 30 Juin 1958

par

Josette CAMBON

née le 1er Janvier 1933 à AJACCIO (Corse)

Pharmacien

Diplômée de Sérologie

Diplômée de Phytopharmacie

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la thèse	MM. DUMAZERT,	Professeur	Président
	BALANSARD	»	Assesseurs
	DELPHAUT	»	
	GREBUS	Agrégé	

LINO-IMP. - BOUL. DESPLACES - MARSEILLE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545820_0029

Josette CAMBON

Pharmacien
Docteur en Pharmacie
Diplômée de Sérologie
Diplômée de Phytopharmacie

ACTION DU LYSOZYME ET DE PROTÉINES A CARACTÈRE BASIQUE SUR LA COAGULATION LA VITESSE DE SÉDIMENTATION L'HÉMAGGLUTINATION

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Travail du Laboratoire de Chimie Générale
et de Microbiologie de la Faculté de Médecine
et de Pharmacie de Marseille

PERSONNEL ENSEIGNANT

Doyen : G. MORIN — Assesseur : J. DELPHAUT

Secrétaire Principal : N..... — Bibliothécaire : Mlle PERRIN

Professeurs honoraires : AUDIBERT, BELTRAMI, BREMOND, GABRIEL, JOYEUX, HECKENROTH, MOIROUD, MONGES, RIMATTEI, ROCHE, CHAUVIN.

PROFESSEURS

Anatomie	GRISOLI
Anatomie Pathologique	GASTAUT
Bactériologie et Pathologie générale	BRAHIC
Botanique et Cryptogamie	PELLISSIER
Cardiologie Clinique et Expérimentale	JOUVE
Chimie	DUMAZERT
Chimie Analytique et Hydrologie	ARNOUX
Chimie Médicale	DERRIEN
Clinique Chirurgicale	CARCASSONNE
Clinique Chirurgicale	LAMY
Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédie	SALMON
Clinique Chirurgicale Thérapeutique et Chirurgie Expérimentale	DE VERNEJOUL
Clinique Exotique	BLANC
Clinique des Maladies du Système Nerveux	CREMIEUX
Clinique Médicale	MATTEI
Clinique Médicale	POINSO
Clinique Médicale Thérapeutique	OLMER
Clinique des Maladies des Voies digestives et de la Nutrition	RECORDIER
Clinique Médicale Infantile	GIRAUD
Clinique Neuro-Chirurgicale	PAILLAS
Clinique Obstétricale et Gynécologique	CHOSSON
Clinique Ophtalmologique	JAYLE
Clinique Oto-Rhino-Laryngologique	APPAIX
Clinique de Stomatologie	MARONNEAUD
Clinique Urologique	N.....
Endocrinologie Médicale	VAGUE
Histologie	PICARD
Hygiène et Médecine Sociale	SAUTET
Matière Médicale	BALANSARD
Médecine Légale et Médecine du Travail	MOSINGER
Parasitologie	RANQUE
Pathologie Interne	AUDIER
Pathologie Chirurgicale	DOR
Pharmacologie	MERCIER F.
Pharmacie Chimique et Toxicologie	VIGNOLI
Pharmacie Galénique	DELPHAUT
Physiologie	MORIN
Physique Médicale	DUBOULOZ
Thérapeutique	PIERI

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. ROUX
DONNET
MOURGUE

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM. BERNARD Pierre
BOURRET
DEPIEDS
DESANTI
GAMBARELLI
GREBUS
MM. LISSITZKY
MERCIER J.
PASTOR
PAYAN
TAMALET

AGREGES EN EXERCICE

MM. BERNARD René
CHARPIN
CHAUVIN
DEVIN
GRANJON
LAVAL
MM. MONGES
MOUREN
ORSINI
PAOLI
RAYBAUD
SERMENT

AGREGES LIBRES

MM. BERTHIER
FIGARELLA
HENRY
IMBERT
MM LENA
OLLIVIER
OURGAUD

Chargé des fonctions de Maître de Conférence

Histologie ..... M. STAHL

Chargés des fonctions d'Agrégés

Hygiène et Médecine Sociale ..... MM. GEVAUDAN
Clinique Dermato-syphiligraphique ..... CALAS

A MES PARENTS,

A MES AMIS,

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur DUMAZERT

Qui n'a cessé de nous faire profiter de ses judicieux conseils, après nous avoir accueillie dans son laboratoire pour nous permettre de réaliser la partie chimique de notre thèse.

Nous lui en sommes infiniment reconnaissante et nous lui exprimons avec notre gratitude, notre profond respect.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BALANSARD

dont l'enseignement clair et vivant ne cessera de rester présent dans notre mémoire.

Nous le remercions bien sincèrement de l'honneur qu'il nous fait en jugeant ce travail. Qu'il trouve ici l'assurance de notre respectueux attachement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR DELPHAUT

Assesseur du Doyen

Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui nous a fait l'honneur de siéger dans notre Jury de thèse.

Nous le remercions profondément de l'accueil bienveillant qu'il nous a témoigné et des conseils éclairés qu'il nous a prodigués au cours de notre expérimentation.

Nous lui exprimons toute notre reconnaissance.

A NOTRE MAITRE,

Monsieur le Professeur GREBUS

Qui nous a formée aux techniques de laboratoire durant les quatre années passées dans son service.

Au terme de ce travail dont nous lui devons l'inspiration, nous ne pouvons que le remercier bien vivement du dévouement avec lequel il nous a dirigée ainsi que des conseils précieux qui ont si grandement facilité notre tâche.

Qu'il veuille bien trouver dans ce modeste témoignage l'expression de notre très grande reconnaissance et de notre fidèle attachement.

A MES MAITRES DE LA FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

A MONSIEUR C. GHIGLIONE

Docteur en Pharmacie,

Assistant de Chimie Générale,

Qui nous a apporté son aide et ses conseils dans l'élaboration de cette thèse.

Qu'il soit assuré de notre gratitude.

A MONSIEUR KOCH,

Qui nous a aidé par ses connaissances techniques dans l'expérimentation sur l'animal.

Nous l'en remercions vivement.

A TOUS MES CAMARADES DU LABORATOIRE
DE MICROBIOLOGIE.

AVANT-PROPOS

LORSQUE nous avons commencé les recherches qui font l'objet de notre thèse, notre intention se limitait à l'étude des propriétés biologiques que le lysozyme pouvait présenter en dehors de son action enzymatique qui permit sa découverte, à savoir, son pouvoir de s'attaquer aux polyosides d'origines microbiennes diverses. Nos recherches devaient nous conduire à considérer dans leur ensemble trois propriétés nouvelles du lysozyme, à savoir son action dans la coagulation sanguine en tant que facteur antihéparinique, son pouvoir d'accélérer la vitesse de sédimentation et enfin d'agglutiner les hématies. Dès lors nous avons voulu pouvoir répondre à la question de savoir si ces trois propriétés pouvaient admettre ou non la même cause déterminante, en l'espèce le caractère nettement basique du lysozyme. Cela nous a entraîné à étudier l'éventuelle participation aux mêmes phénomènes biologiques d'autres protéines basiques telles que les protamines et les dérivés per-méthylés de diverses protéines.

INTRODUCTION

A) LE LYSOZYME

Au cours d'une étude sur *Bacillus Subtilis*, NICOLLE (21) mit en évidence l'existence de facteurs lytiques de nature enzymatique. C'est en 1909 que LASCHTSCHENKO (21) conclut à une action bactéricide du blanc d'œuf de poule due à un enzyme. FLEMING (21) en poursuivit l'étude, vérifia ses propriétés lysantes et par analogie d'action avec celle des « ferments » donna à ces facteurs lytiques le nom de lysozyme .

Le lysozyme est très répandu aussi bien dans le règne animal que dans le règne végétal. On le trouve dans des liquides biologiques tels que les larmes, le mucus nasal, la salive, le sérum, le plasma, les leucocytes polynucléaires, les sécrétions duodénales du porc. Certains extraits tels que ceux du Ficus et du Papaya, les navets, contiennent une substance enzymatique comparable au lysozyme étudié par FLEMING. C'est toutefois le blanc d'œuf qui en est la principale source et la plupart des recherches entreprises ont été effectuées avec l'enzyme extrait de ce liquide.

C'est en 1927 que WOLF (9) proposa la première préparation du lysozyme par extraction du blanc d'œuf. De nombreuses techniques ont été exposées depuis. Nous retiendrons celle mise au point par ELDERTON et FEVOLD, qui s'est révélé chromatographiquement la plus satisfaisante et dont nous rapportons le mode opératoire :

« Du blanc d'œuf débarrassé des chalazes est homogénéisé et additionné de solution de soude jusqu'à pH = 9,5, ainsi que de 5 p. 100 de chlorure de sodium, ensemencé avec quelques cristaux de lysozyme, puis maintenu à la température de 4° C. Le milieu montre, quatre à cinq jours après, une grande quantité de fines aiguilles. Le produit ainsi cristallisé est redissout dans une solution diluée d'acide acétique (le pH doit être compris entre 4 et 6). On élimine tout le matériel insoluble par centrifugation, et on recristallise soit par addition de 5 p. 100 de chlorure de sodium à pH 9,5 — 10, soit en ajoutant à la solution acide 5 p. 100 de bicarbonate de sodium à pH = 9 — 8,5. Cette opération répétée à cinq ou six reprises fournit un lysozyme cristallisé pur, soit sous forme de chlorhydrate, soit sous forme de carbonate ».

Sous ces dernières formes, il peut être lyophilisé, la poudre obtenue, conservée en tube scellé, garde alors indéfiniment ses propriétés. Toute notre expérimentation a été réalisée avec du lysozyme lyophilisé.

La pureté des préparations est contrôlée par vérification de son homogénéité à l'électrophorèse, à la sédimentation lors de sa solubilité suivant certaines conditions dans les solutions salines, à

la chromatographie et à certains procédés immunologiques comme, par exemple, la précipitation spécifique de l'enzyme par une fraction anti-lysozyme d'un sérum obtenu expérimentalement chez l'animal.

Les travaux de MEYER et Coll. (21) sur le blanc d'œuf nous permettent déjà de considérer cet enzyme comme une protéine basique. Un peu plus tard, d'autres auteurs effectuant des études sur une forme plus purifiée : la forme cristalline, confirment sa nature basique et lui attribuent un point isoélectrique à pH 10,5 — 11.

C'est une protéine de poids moléculaire relativement bas, soit 15.000 environ, soluble et thermostable en milieu acide, insoluble et thermolabile en milieu alcalin. Le lysozyme est sensible à l'action de l'alcool et de l'acétone qui le précipite de ses solutions.

Il est facilement adsorbé par les filtres de porcelaine, le papier, le charbon. Il ne dialyse pas à travers une membrane de collodion de porosité convenable, il cristallise facilement surtout au voisinage de son point iso-électrique.

Son spectre en ultra-violet a été étudié par FROMAGEOT et SCHNECK (8), en milieu acide comme en milieu alcalin, ce qui a permis d'établir que sa constitution comporte 6 molécules de tryptophane, 3 molécules de tyrosine et 5 molécules de cystine. Si l'oxydation de la protéine en milieu alcalin est évitée, les variations de ce spectre d'absorption en fonction du pH sont réversibles.

Sa composition chimique a été l'objet de travaux de nombreux auteurs, nous rappelons dans le tableau ci-dessous les conclusions auxquelles sont arrivés en France FROMAGEOT et PRIVAT DE GARILHE (7)

COMPOSITION CHIMIQUE DU LYSOZYME D'APRES FROMAGEOT ET PRIVAT DE GARILHE

	g. p. 100 de lysozyme	Nombre de radicaux
Azote	18.6	195
Soufre	2,53	12
Glycocolle	5.6	11
Alanine	6,1	10
Sérine	7,2	10
Cystine	8	5
Thréonine	5 3	7
Méthionine	2.3	2
Valine	6,2	8
Leucine	7	8
Isoleucine	6,2	7
Phénylalanine	2 3	2
Proline	1 3	2
Tyrosine	3 8	3
tryptophane	8 3	6
Ac. Aspartique	11 8	13
Ac. Glutamique	3 3	4
Lysine	6	6
Histidine	1 05	1
Arginine	14 8	13
Azote amidé et divers	1,86	—
Poids moléculaire moyen		14 700 ± 250

L'absence de phosphore est confirmée par WEILER et STRAUSS (7). Antérieurement MEYER et Coll. en avaient trouvé 0,38 p. 100.

Les caractères essentiels de cet enzyme sont : la richesse en tryptophane et l'absence de groupements sulfhydryl. Par ailleurs la grande quantité d'arginine est en rapport avec ses qualités basiques.

La composition centésimale en acides aminés ayant été déterminée, les travaux portèrent alors sur la structure du lysozyme. FROMAGEOT, ACHER, JUTISZ (1) prennent comme base l'isolement et l'identification des peptides résultant d'une hydrolyse ménagée de la protéine enzymatique. Après action de l'acide chlorhydrique 1ON à 37° pendant huit jours, ils obtiennent des acides aminés libres et des peptides courts. Parmi ceux-ci, l'étude de la partie basique par adsorption sur silice leur a paru la plus intéressante (2). On n'observe en général, parmi ces peptides courts que deux à six acides aminés. Une chromatographie à deux dimensions sur papier révèle la présence d'une base : arginine ou lysine en tête de chaîne. Une hydrolyse totale permet de donner les résultats suivants :

— On obtient des tri, tétra et penta-peptides en majorité par rapport à des peptides plus longs ;

— Les peptides courts (di —) ont été déterminés comme suit : ce sont sept amino-acides : glycine, sérine, acide aspartique, acide glutamique, thréosine, cystine, alanine

Il est très difficile de donner l'exacte structure du lysozyme. On peut cependant prévoir les enchaînements suivants : arginyl - cystine, arginyl - ac. aspartique, lysyl - ac. aspartique et lysyl glycocolle. La lysine serait l'acide aminé N-terminal et la leucine, l'acide aminé C-terminal.

Le dosage de l'activité enzymatique du lysozyme est basé, soit sur la lyse des bactéries vivantes ou mortes, soit sur la variation de viscosité d'un milieu constitué par des micro-organismes ou par un muco-polysaccharide microbien.

FLEMING utilise un coccus gram + : *Micrococcus Lysodeikticus*, et étudie par dilutions successives de lysozyme, celle qui est apte à lyser une suspension de ce germe. BOASSON détermine par mesures optiques les variations de turbidité de tels mélanges au cours de la lyse. Des dosages turbidimétriques et néphélémétriques ont été décrits par différents auteurs.

MEYER et HAHNEL, outre leur proposition de dosage turbidimétrique au cours de la lyse des bactéries par le lysozyme exposent une mesure de la variation en fonction du temps de la viscosité d'une solution de mucopolysaccharide acétylé extrait de *M. Lysodeikticus*. Si cette méthode a l'avantage de n'employer que très peu d'enzyme, elle présente par contre une extraction longue du substrat.

Tout en apportant des idées précises sur la fonction lytique du lysozyme, ces dosages ont permis de préciser la nature des facteurs influençant l'activité de cet enzyme.

La température, le pH ont une influence certaine sur l'activité lytique du lysozyme. Pour *Micrococcus Lysodeikticus*, organisme très sensible à l'action de l'enzyme, le pH optimum se situe entre 6 et 7 et la température à un maximum de 60° C.

FRAENKEL et CONRAT signalent l'inhibition de l'action du lysozyme par les oxydants (iode). La concentration saline intervient lors de la lyse et WOLF précise l'importance du chlorure de sodium a des concentrations inférieures à 8 p. 1000. A des concentrations supérieures à 14 p. 1000, l'action favorisante ferait place à une action inhibitrice.

Pendant longtemps, seule l'activité enzymatique du lysozyme a retenu l'attention des chercheurs. A l'heure actuelle, à la suite particulièrement des travaux de SALTON (20), il ressort que l'action enzymatique vis-à-vis des bactéries est précédée d'une phase physico-chimique d'action électrostatique ; vis-à-vis des espèces sensibles, l'action enzymatique suit l'action physico-chimique ; vis-à-vis des espèces résistantes, seule la première phase a lieu.

On doit donc envisager l'action physico-chimique du lysozyme c'est-à-dire son action non enzymatique et par ailleurs son activité enzymatique.

1° Action non enzymatique.

FRIEDBERGER et HOGER remarquèrent qu'en présence d'une faible quantité de lysozyme les organismes ne sont pas lysés mais agglutinés. Ces auteurs entreprirent une série d'essais qui leur permirent de conclure à deux actions différentes du lysozyme : action lytique et possibilité d'agglutination. Cette dernière propriété serait valable même vis-à-vis des bactéries résistantes.

De nombreux auteurs ont été d'accord sur ce point et l'ont attribué au caractère basique du lysozyme.

Avec les substances acides, on observe d'ailleurs la formation de complexes acides-bases (SKARMS et WATSON). Ceux-ci sont responsables, en partie tout au moins, de l'inhibition de l'action lytique du lysozyme. Encore est-il que pour avoir une inhibition complète on observe qu'il faut un excès de substances par rapport à celui que nécessite une réaction stéchiométrique. Une étude électrophorétique montre que le complexe se forme à des pH où les protéines transportent des charges opposées. On n'observe qu'une seule limite électrophorétique.

CAPUTO a étudié de cette façon des mélanges de lysozyme et de pepsine cristallisés à des pH différents. Le complexe formé peut-être dissocié à l'aide de chlorure de sodium et sa solubilité est fonction de la force ionique.

Si l'on met en présence le lysozyme et une suspension de microorganismes tués par la chaleur on voit la turbidité du mélange augmenter. Un phénomène identique est observé avec la salmine (WOLF et coll. sur *B. Megatherium* - WILCOX et DANIEL sur *M. Lysodeikticus*).

On peut conclure qu'il y a formation d'un complexe enzyme - substrat. Celui-ci étant influencé par des concentrations différentes d'ions sodium, on peut identifier son comportement à celui du lysozyme en présence des substances acides.

SALTON précise par ces expériences l'affinité du lysozyme pour les charges négatives situées à la surface des bactéries. L'agglutination se produirait lors de la neutralisation de ces charges.

2° Action enzymatique.

Mais il ne faut pas oublier que FLEMING donna le nom de « lysozyme » à une substance fortement bactériolytique capable de lyser des suspensions de bactéries. L'étude du mécanisme de cette action a été entreprise par de nombreux auteurs. Nous essaierons de résumer les principaux travaux.

THOMSON (21) montre que les bactéries non traitées présentent des sensibilités différentes. Les germes gram + sont les plus sensibles.

Toute bactérie possède en plus de sa membrane protoplasmique une membrane d'enveloppe, une « cell-wall », qui forme autour d'elle une coque de protection. Le problème était donc de savoir au niveau de quelle membrane se situait le substrat.

On a remarqué avant la lyse, un gonflemenet des cellules dû à l'altération de la cell-wall : était-ce par suite de l'hydrolyse d'une substance mucoïde (MEYER et Coll.) contenue dans la membrane bactérienne, ou bien par une perméabilité soudaine de cette dernière (BOASSON). On utilisa alors le microscope électronique pour suivre l'effet lytique du lysozyme.

KERN et Coll. firent incuber *M. Lysodeikticus* en présence de lysozyme et notèrent les stades suivants (21) : gonflement des cellules, rupture de la cell-wall et dispersion du contenu cellulaire. On observait à la fin de la lyse de chaque cellule, la présence de deux petites masses opaques, probablement du protoplasme coagulé. Cette action lytique se révèle exacte pour les bactéries vivantes aussi bien que pour celles tuées par la chaleur.

TOMESIK et GUEZ-HOLZER, puis WELSHIMER confirmèrent la dissolution de la cell-wall. Le substrat du lysozyme se trouvait donc dans cette membrane. Des essais d'isolement de « cell-wall » furent entrepris et les nombreux travaux aboutirent aux résultats suivants : D'après HALLAUER, MEYER et Coll. (9) l'enzyme agit sur les mucopolysaccharides en hydrolysant les liaisons chimiques qui les retiennent au cytoplasme.

L'analyse des produits finaux de la lyse a montré qu'on obtenait une forte proportion de substances réductrices libres, du phosphate sous forme minérale et des acides nucléiques.

MEYER et HAHNEL (21), par l'extraction du polysaccharide de *M. Lysodeikticus* et incubation de celui-ci avec du lysozyme ont montré la production de N-acétylhexosamine.

Plus tard, CUMMINS et HARRIS, dans une étude de germes sensibles ou résistants au lysozyme ont fait apparaître que les cell-walls des bactéries gram + contenaient une plus grande quantité d'hexosamine que celle des bactéries gram —. De plus, les bactéries gram + semblaient posséder un composant caractéristique : un sucre aminé.

L'action du lysozyme sur les membranes de *M. Lysodeikticus*, *Sarcina lutea* et *B. Megatherium* donne un produit de lyse auquel on fait subir une chromatographie sur papier. Celle-ci révèle un composant commun, ayant un comportement voisin de celui de la N-acetylglucosamine en ce qui concerne sa réaction avec le phtalate d'aniline, mais à l'inverse du sucre acétylaminé, agit, lors de l'électrophorèse, comme une substance acide.

D'après SALTON (21) « on peut ainsi caractériser la principale substance libérée par le lysozyme comme un complexe de glucosamine et d'un sucre aminé possédant un groupement carboxyl. Le complexe est sous forme d'un disaccharide et les sucres sont acétylés ». Le lysozyme étant inactif sur le polysaccharide désacétylé. STRANGE a caractérisé le sucre aminé comme étant une 3 - o - α - carboxy-éthyl-hexosamine.

Les propriétés enzymatiques peuvent être résumées en trois points :

1) Hydrolyse du mucopolysaccharide des membranes ;

2) Libération de groupes réducteurs ;

3) Libération d'un complexe sucré acétylaminé de glucosamine et d'acide hexosaminé.

Mais on ne doit pas oublier le fait que, grâce à ses propriétés basiques, le lysozyme peut former des complexes avec des substances chargées négativement, « c'est-à-dire, les composés anioniques des surfaces actives » (SALTON [20]). Ce caractère basique du lysozyme implique, comme le signale cet auteur, « son aptitude à agglutiner les bactéries et à augmenter la turbidité de certaines suspensions microbiennes chauffées de la même façon que les protéines basiques comme la salmine » ; vis-à-vis des microorganismes sensibles, il y aurait donc d'abord un phénomène physico-chimique d'attraction, d'où résulterait l'accolement enzyme-bactéries et ensuite l'action enzymatique proprement dite.

Ces modalités d'action du lysozyme vis-à-vis des microorganismes, expliquent les propriétés biologiques importantes accordées à cet enzyme à la suite des travaux de VIOLLE en 1952

(Lysozyme et coagulation sanguine), de DUMAZERT et GHIGLIONE en 1953 et 1956 (antagonisme de l'héparine et du lysozyme *in vitro* et *in vivo*). Ces auteurs se sont attachés à l'étude du rôle du lysozyme dans la coagulation sanguine et ont démontré qu'il agit comme un facteur coagulant.

Nous allons donc étudier ce nouvel aspect des propriétés du lysozyme. Sans nous étendre très longuement sur le mécanisme de la coagulation sanguine, nous croyons bon toutefois, avant de passer à la description des travaux précédemment cités, d'en exposer le principe.

La coagulation du sang résulte de la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble. Celle-ci enserrant alors dans les mailles du réseau formé les éléments figurés du sang, détermine la formation d'un caillot.

L'étude du mécanisme intime de cette formation est difficile par suite de la complexité du phénomène. De nombreuses théories ont été émises depuis SCHMIDT en 1895 et MORAWITZ en 1905 qui apportèrent les premières considérations scientifiques. C'est en somme une base solide qu'ils ont donnée à cette étude puisque leurs travaux demeurent toujours valables dans leur ensemble.

On peut considérer deux sources de facteurs de coagulation : le plasma et les éléments figurés (plaquettes sanguines ou thrombocytes) (17).

Dans le plasma nous trouvons : le fibrinogène, les ions Ca^{++}, la prothrombine ou thrombogène, prodiastase synthétisée par le foie.

Dans les thrombocytes : la thrombokinase.

Dans un premier temps MORAWITZ décrit l'union de la prothrombine et de la thrombokinase en présence d'ions Ca^{++} en vue d'aboutir à la formation d'un agent actif, la thrombine. Cette dernière se combine avec le fibrinogène et on obtient la fibrine qui, en formant un réseau à mailles très fines, entraîne les globules rouges dans la formation d'une masse solide le caillot. La thrombokinase se trouverait sous forme inactive, ce qui explique la non-coagulation naturelle du sang. (6)

Depuis quelques années de nombreuses théories beaucoup plus complexes ont été émises (10). Il serait trop long d'en faire l'exposé ici. Nous nous contenterons d'en citer quelques-unes : La théorie des facteurs coagulants de OWREN, MAUPIN, QUICK, SEEGERS, KOLLEN. La théorie des profacteurs : proaccélérine et proconvertine. La théorie de l'équilibre fluido-coagulant de TOCANTINS, qui fait intervenir le rapport entre inhibiteurs et coagulants. La théorie des facteurs amphotères, dans laquelle aux concentrations moyennes, la thromboplastine accélère fortement la coagulation, alors qu'aux concentrations très fortes, elle aurait une action anticoagulante légère.

Et tout récemment (juillet 1957) (22) les travaux de l'école d'Oxford, qui font intervenir dans le premier stade de la coagulation ou thrombo-plastino-formation des facteurs plasmatiques tels que les facteurs antihémophiliques A, B et C et des facteurs plaquettaires. Ces derniers comprennent les facteurs : 1 (voisin de la proaccélérine), 2 (accélérant la réaction thrombine-fibrinogène), 3 (de nature phospholipidique, accélérant la thromboplastino-formation) et le facteur 4 (ayant une activité anti-héparinique) qui, par inter-réaction, aboutiraient à la formation d'une thromboplastine incomplète, inactive. Pour obtenir la thromboplastine active il faut l'intervention de trois facteurs plasmatiques : pro-accelerine, pro-convertine, facteur Stuart.

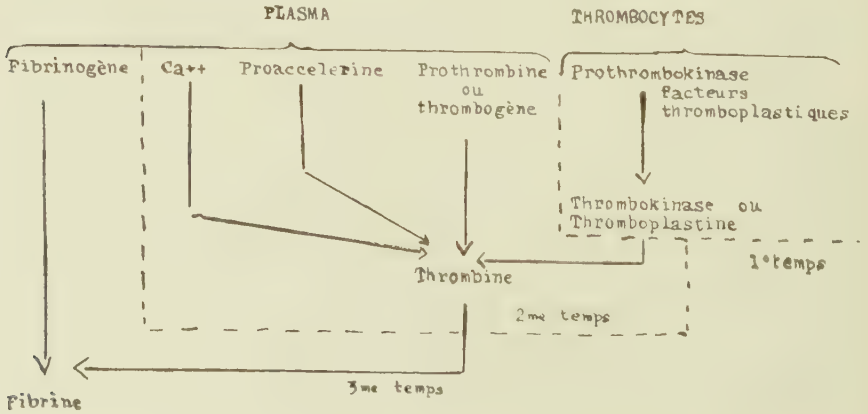
Le deuxième stade est la thrombino-formation, la fibrino-formation constitue le troisième stade.

La conception moderne du mécanisme de la coagulation sanguine, dans sa forme la plus simple est proposée comme suit :

Le choc colloïdo-chimique qui aboutit à l'éclatement des plaquettes et qui consiste à la mise en contact du sang avec une paroi mouillable, provoque la libération de substances thromboplastiques (ces dernières existent aussi dans les tissus : cerveau ou poumon). Sous leur influence, la prothrombokinase est transformée en thrombokinase active qui sépare la prothrombine en thrombine et en un composé inhibiteur de la thrombokinase.

La thrombokinase n'acquiert son activité maxima qu'en présence d'un activateur labile, de nature euglobinique appelé Facteur V ou facteur labile de QUICK. C'est encore la proaccélerine d'OWREN et l'acide globuline plasmatique de SEEGERS. Nous résumons ces observations dans le schéma suivant :

Schéma simplifié de la coagulation sanguine:



L'étude de la coagulation sanguine ainsi représentée nous permet d'envisager très brièvement le problème des substances anticoagulantes.

Parmi les thérapeutiques actuelles, les anticoagulants ont pris une place importante : selon J.-P. SOULIER (23) ils peuvent être divisés en deux classes : d'une part les substances qui agissent comme antivitamine K (dicoumarol et ses dérivés), d'autre part celles qui agissent en diminuant le taux de thrombine du sang par inhibiton de la thrombo-plastino-formation. Tel est le cas de l'héparine qui représente l'anticoagulant naturel circulant et des substances qui provoquent sa sécrétion dans le torrent circulatoire. Ces thérapeutiques n'étant pas sans danger, il a été nécessaire de proposer des substances d'action suffisamment rapide et dont le rôle est d'annuler l'action des anticoagulants.

L'héparine étant, parmi les anticoagulants, la substance la plus utilisée, on a proposé, afin d'annuler son action, les protamines telles que la salmine et la cupléïne. A la suite des travaux de VIOLLE d'une part et de DUMAZERT ET GHIGLIONE d'autre part sur le lysozyme, l'attention s'est alors portée sur cette substance.

En 1952, VIOLLE (5) signale le lysozyme comme un nouvel agent coagulant. Après injection de lysozyme au lapin, il observe immédiatement après, une accélération nette de la coagulation. L'effet est maximum au bout d'une heure et s'annule au bout de quatre heures. Si la quantité de lysozyme injectée est augmentée progressivement, on allonge seulement la durée d'action de l'effet coagulant sans en augmenter l'intensité.

En 1953, puis en 1956, DUMAZERT et GHIGLIONE ont montré que le lysozyme, substance coagulante, non anaphylactisante et non allergisante, peut être utilisée comme substance antihéparinique. Cette étude a été conduite chez le chien après confirmation de l'action coagulante du lysozyme injecté par voie intra-veineuse. Le mécanisme de cette action serait dû à l'antagonisme entre le lysozyme et l'anticoagulant circulant : l'héparine. La vérification de cette hypothèse a été réalisée de la façon suivante : (4) (5)

In vitro, l'addition d'une solution de lysozyme à une solution d'héparine à pH = 7 provoque la formation d'un complexe insoluble. L'examen chimique permet de conclure que ces deux corps se combinent en raison de l'affinité des groupements sulfuriques acides libres de l'héparine pour les groupements aminés libres de la protéine. Une telle combinaison est susceptible de s'effectuer lorsque ces deux substances se déplacent convenablement lors d'une électrophorèse sur papier. Dans la zone d'union des deux substances le composé ne migre plus sous l'influence du champ électrique.

In vivo, les expériences réalisées chez le chien hépariné ont montré que le lysozyme injecté par voie intraveineuse, postérieu

rement à l'injection d'héparine, permet de ramener rapidement (de 30 minutes à 1 heure) le sang des animaux héparinés à des conditions de coagulation normale.

Le lysozyme est susceptible également de prévenir et d'annuler l'action anticoagulante de la peptone de WITTE, action expliquée par le fait qu'elle déclanche chez l'animal une décharge d'héparine dans le torrent circulatoire. Par contre, l'effet anticoagulant du dicoumarol qui entraîne une diminution du taux de prothrombine n'est pas contre-balancé par le lysozyme.

Tout récemment PERUGINI (15) signale que l'action coagulante du lysozyme observée chez les animaux, vient d'être confirmée chez l'homme en associant l'administration du lysozyme au test de tolérance à l'héparine. L'intensité de l'action varie suivant la voie d'administration. **In vitro,** cependant, le lysozyme ne raccourcit pas le temps de coagulation, ni celui de recalcification du plasma. Il ne modifie nullement son activité prothrombinique, ni chez le sujet normal, ni chez les patients atteints d'hypoprothrombinémie. L'adjonction **in vitro,** de lysozyme au plasma de ces derniers n'en modifie pas le temps de QUICK. Par contre son adjonction au plasma hépariné provoque une réduction du temps de recalcification.

Cet enzyme n'agirait donc pas à proprement parler sur le déroulement de la coagulation. Il n'interviendrait dans ce phénomène qu'en tant qu'antihéparinique et ne peut nullement remédier à une déficience en prothrombine.

En résumé le lysozyme peut être considéré comme une protéine pure, obtenue essentiellement à partir du blanc d'œuf et à l'état cristallisé. On connaît actuellement sa structure chimique et la teneur en ses principaux constituants, ainsi que ses constantes physiques et chimiques.

Ses propriétés biologiques, en tant qu'agent lytique ou qu'agent coagulant, en font une protéine précieuse. PERUGINI le signale comme « un remède d'urgence, utilisable dans l'attente de pratiquer la thérapie substitutive, et pour renforcer cette dernière ainsi que dans le traitement pré et post-opératoire des hémorragies ».

B) PROTAMINES, GLOBINE, ET QUELQUES METHYL-PROTEINES

Notre étude ne s'étant pas bornée uniquement à certaines actions du lysozyme, mais aussi à celles de quelques protéines à point isoélectrique alcalin comme celui de l'enzyme, nous allons rappeler ici les notions essentielles les concernant.

1) Protamines.

Ce sont les protéines les plus simples. Elles ont été découvertes dans le sperme de poisson (laitance) par MIESCHER (16). On

n'en trouve par contre, ni dans les tissus des vertébrés supérieurs, ni chez les végétaux. Leur préparation s'effectue de la façon suivante : (12) La laitance de poisson est broyée et mise en suspension dans l'eau. L'addition d'acide acétique précipite les têtes de spermatozoïdes ansi que les noyaux des autres cellules. Après filtration et lavage, on ajoute de l'acide sulfurique dilué. La protamine passe en solution avec un certain nombre de bases puriques, les acides nucléiques restent insolubles.

Le sulfate de protamine est précipité par addition d'alcool, purifié par transformation en picrate après redissolution du précipité alcoolique dans de l'eau. Le picrate est décomposé par addition d'acide sulfurique. L'acide picrique libéré est extrait par l'éther. On précipite le sulfate de protamine par addition d'alcool.

Les protamines ont surtout été étudiées par KOSSEL et son école.

Elles sont solubles dans l'eau où elles ont une réaction alcaline. Les sels (sulfate ou chlorhydrate) sont des poudres blanches, non hygroscopiques, dont les solutions aqueuses sont levogyres.

Leur point isoélectrique est compris entre pH 11 et 12. Ce sont donc des bases fortes qui se combinent avec les acides, même faibles (ascorbique, phosphorique) Elles se combinent aussi aux groupements carboxylés de nombreuses protéines en donnant des composés stables. C'est cette propriété qui permet la formation du complexe Protamine-Insuline dont la place en thérapeutie n'est pas discutée.

Les protamines comprennent de nombreux composés dont le poids moléculaire varie de 800 à 5.000. Leur hydrolyse aboutit à la formation de bases hexoniques (arginine, lysine, histidine) qui permettent de considérer 3 groupes de protamines :

— les monoprotamines, un seul acide aminé basique : arginine
— les diprotamines, arginine + histidine ou lysine
— les triprotamines, arginine + lysine + histidine

Les premières sont les plus importantes et comprennent :

— la scombrine isolée du maquereau
— la salmine isolée du saumon
— la cupléïne isolée du hareng
— la sturine isolée de l'esturgeon
— la cyclopterine isolée du Cyclopteris
— l'iridine et la truttine isolées de la truite
— la thynnine isolée du thon.

La cupléïne, une des plus utilisées, contient 22 molécules d'arginine et 11 molécules d'acides monoaminés dont les principaux sont : l'asparagine, la proline, l'alanine, la sérine et la valine.

Ce sont des protéines non soufrées.

On emploie les protamines comme antagonistes de l'héparine. Mais aussi, d'après les travaux de HAGEDORN et Coll (12), sous

forme d'insulinate de protamine, dans le but de retarder et de prolonger l'effet hypoglycémiant de l'hormone pancréatique. L'addition de zinc accroît encore cet effet.

II - **Globine.**

La globine est un constituant protéique du pigment respiratoire.

Elle a été préparée selon la méthode d'ANSON et MIRSKY. Le premier temps consiste à obtenir une solution d'hémoglobine. Pour cela on sépare par centrifugation les globules rouges du sang total. Ces globules rouges sont mélangés à de l'eau physiologique. Après centrifugation et trois lavages, ils sont additionnés d'un égal volume d'eau et de quelques gouttes d'éther qui serviront à les laquer. Après 24 heures au réfrigérateur on sépare les stromas globulaires par centrifugation et filtration sur ouate de cellulose.

Le deuxième temps correspond à la préparation proprement dite de la globine :

Dans un ballon refroidi par un bain de glace on verse un litre d'acétone et 20 ml d'acide chlorhydrique pur. Par une ampoule à décantation on laisse tomber, en agitant constamment, 100 ml de la solution d'hémoglobine goutte à goutte. L'acide décompose cette dernière en ses deux constituants : l'hématine et la globine qui précipite. On recueille ce précipité sur filtre Büchner et on le lave à l'acétone pur. Il est séché deux à trois fois par un rinçage à l'éther glacé anhydre et ensuite placé à l'excicateur.

La globine ainsi obtenue est une poudre fine, blanche assez soluble dans l'eau. Sa pureté est déterminée par électrophorèse. Son point isoélectrique se situe environ à pH = 7 - 7,5. Elle a, en général une réaction alcaline, bien que ROCHE ait trouvé une réaction acide à la globine des invertébrés. La dénaturation déplace son point isoélectrique vers l'alcalinité (pH = 8,2).

La globine est très riche en acides diaminés et en particulier en histidine. Sa teneur en soufre est variable suivant l'espèce et suivant l'état du sujet : groupe sanguin par exemple.

Nous avons constaté par des expériences pratiquées chez le lapin qu'elle n'était ni allergisante, ni anaphylactisante.

En Amérique, on emploie la globine extraite des hématies de bœuf, en association avec l'insuline. Son activité serait comparable à celle du mélange insuline - zinc - protamine.

Mais la globine est surtout importante en tant que protéine constitutive du pigment respiratoire. Par sa fixation avec l'hème, masses élémentaires de poids moléculaires minima (17.000) étudiées par ADAIR et SWEDBERG, elle forme l'hémoglobine dont l'étude sort du cadre de nos recherches.

III) **Méthyl-Protéines.**

La méthode de méthylation a été conduite selon le procédé de EDLBACHER que nous décrirons puisqu'il est le même pour les quatre méthyl-protéines étudiées dans notre travail.

Dans un ballon de 500 ml on met une solution à 10 p. 100 de protéine à méthyler. Le ballon est maintenu dans un bain de glace sous agitation mécanique, on introduit en une demi-heure 50 ml d'une solution de soude à 10 p. 100 préalablement glacée. La température doit être maintenue aux environs de 0° pendant toute la durée de l'opération. On ajoute goutte à goutte 10 g. de sulfate de diméthyle. L'agitation est maintenue pendant encore un quart d'heure. A la liqueur obtenue on ajoute une solution à 10 p. 100 d'acide sulfurique refroidi, jusqu'à virage de la phénolphtaléine. On obtient un épais floculat blanc que l'on centrifuge. Le culot de centrifugation est placé dans un ballon avec 50 ml d'eau distillée glacée. On verse une solution glacée de soude à 10 p. 100 jusqu'à dissolution complète. On acidifie à l'aide d'une solution glacée d'acide sulfurique à 10 p. 100. Il se forme alors un précipité qui est lavé trois fois avec du sulfate de soude saturé. Après centrifugation on place ce précipité dans un ballon surmonté d'un réfrigérant ascendant avec 100 ml d'alcool à 80 p. 100 en volume. Le produit se dissout dans l'alcool chaud et la solution obtenue est filtrée à chaud. Après refroidissement de la liqueur alcoolique on précipite la méthyl protéine par deux fois son volume d'éther. Dans le cas de la méthyl-globine l'extraction finale se fera par dissolution du précipité obtenu avec l'éther dans 150 ou 200 ml d'eau distillée. On précipite par trois fois son volume d'acétone. Après une heure de repos à la glacière, on centrifuge, on lave trois fois à l'éther anhydre et on place à l'excicateur.

Dans le cas de la préparation de la caséine méthylée, le précipité obtenu avec l'éther a été recueilli, lavé à l'alcool absolu et deux fois à l'éther avant de le faire sécher.

La méthylation de la zéine et de l'édestine, protéines insolubles dans l'eau, s'effectue après une mise en suspension dans une solution de soude à 3,3 p. 100 (5 g. de protéine pour 75 ml de soude). La suite des opérations a été conduite de la même façon.

Après la précipitation par l'éther anhydre répétée plusieurs fois, le précipité a été lavé à l'éther et placé à l'excicateur.

Methyl - Globine.

Elle a été obtenue par méthylation de la globine extraite des hématies de bœuf.

La méthylation confère à cette protéine un point isoélectrique plus alcalin que celui de la globine. C'est une poudre beige clair, soluble dans l'eau. Sa teneur en azote est inférieure à celle de la protéine non méthylée. Il y a donc eu fixation des groupements méthyle au détriment de ce dernier.

Nous étudierons son rôle successivement dans la coagulation sanguine, la vitesse de sédimentation et l'hémagglutination.

Des essais pratiqués chez le lapin et la souris, nous ont montré que cette protéine n'était ni anaphylactisante, ni allergisante.

Méthyl - Edestine.

La méthyl édestine est obtenue par méthylation de l'édestine. L'édestine est une globuline cristallisable extraite des graines de chênevis ou fruit du chanvre Cannabis Sativa. Les graines de courge, de ricin, de céréale et le melon sembleraient aussi en contenir. R. CORTESI (3), donne toutes les indications botaniques relatives à Cannabis Sativa (Urticacées Dicotylédones).

Le mode d'obtention de l'édestine a été décrit en 1881 par RITTHAUSEN, puis en 1892 par OSBORNE. Après broyage, les graines sont dégraissées par macération en présence de benzène. On les traite ensuite par une solution de chlorure de sodium à 3 p. 100, à une température de 60°. L'édestine forme une combinaison avec le radical acide de ce dernier et on obtient la formation de chlorure insoluble dans l'eau et de bichlorure soluble. On ajoute une solution saturée de baryte, on filtre et on laisse à la glacière. On constate le lendemain, l'apparition d'un dépôt dense et cristallin d'édestine. La purification comporte les opérations suivantes : On ajoute tout d'abord une solution à 20 p. 100 de chlorure de sodium qui dissout l'édestine ; on filtre sur noir animal. Le filtrat dilué avec de l'eau est porté à 50° puis à la glacière une nuit. Après décantation, on ajoute une solution de chlorure de sodium à 10 p. 100, puis on neutralise par la soude à 50°, et on porte à nouveau à la glacière. Ce troisième précipité obtenu est lavé avec une solution glacée de chlorure de sodium à 1 p. 100. Des lavages successifs sont effectués à l'eau froide, l'alcool absolu et l'éther ; on sèche sous vide.

C'est une poudre cristalline, de couleur crème, de saveur fade, non hygroscopique. Son poids moléculaire est l'objet de valeurs diverses depuis 3.680 jusqu'à 207.000 (SWEDBERG) et même 335.000 (BEECKMANS et LONTIE (19). Son point de fusion totale est de 255°. ENSELME étudie son spectre d'absorption. Le peu d'absorption d'une solution d'édestine en ultra-violet est témoin de sa richesse en azote et cette non absorption est fonction de sa teneur élevée ou pas en mono-amino-acides phénoliques. La variation de pH influe sur la représentation du spectre. HITCHCOCK fixe son point isoélectrique à pH = 5,5 - 6. Son pouvoir rotatoire est (α) D = - 41° 70 (en solution de chlorure de sodium à 10 p. 100). Elle est insoluble dans l'eau pure et les solvants organiques, soluble dans l'eau, l'acide lactique, la soude et la potasse en solutions diluées. La méthylation rend la protéine soluble dans l'eau pure.

Les solutions d'édestine s'oxydent facilement à l'air (19). Son extraction en présence de cyanure l'en préserve. La protéine présente un caractère amphotère. Sa composition est de 0,87 p. 100

en soufre, de 16,96 p. 100 en azote. OSBORNE a donné une teneur de 4,3 p. 100 en tyrosine et de 3,93 p. 100 en phénylalanine.

La composition en acides aminés est assez discutée et leur obtention varie d'ailleurs suivant l'agent d'hydrolyse utilisé. D'après PACE (14), elle renfermerait : 2,19 p. 100 d'histidine, 14,17 p. 100 d'arginine, 1,65 p. 100 de lysine. Elle contiendrait en outre : glycocolle, alanine, valine, leucine, sérine, acides aspartique et glutamique, proline, oxyproline, cystine et tryptophane.

Ses solutions présentent un état colloïdal et peuvent floculer par addition de sels neutres saturés ou coaguler par les hydrates de métaux ou la chaleur.

A un pH inférieur à 5,4 on obtient de l'édestane ou édestine dénaturée qui précipite en présence d'électrolytes même à concentration très faible. On explique cette transformation par une scission de la molécule primitive en molécules plus petites qui s'agglomèrent peu à peu et précipitent.

Les ferments protéolytiques, en particulier la pepsine (3), la transforment en une albumose, l'édestone, puis en une peptone.

Son point isoélectrique alcalin, renforcé par la méthylation nous a fait étudier son rôle dans les réactions d'hémagglutination.

Méthyl-Zéine.

Elle est obtenue par méthylation de la zéine. Cette substance, d'origine végétale est présente dans la farine de maïs et selon GORHAM en serait le principe glutineux.

On peut la préparer selon la méthode d'OSBORNE en traitant la farine de maïs par l'alcool à 80 p. 100 en volume.

C'est une prolamine, soluble dans l'alcool à 70°, insoluble dans l'eau, légèrement soluble dans l'acide chlorhydrique d'où l'eau la précipite. C'est une poudre blanche qui serait constituée par un mélange de gélatine et de caséine végétales. Le point isoélectrique de la méthylzéine est à pH = 4,2 alors que la protéine non méthylée possède un point isoélectrique dans une zone de pH plus acide. La teneur en azote est de 11,8 p. 100 avant la méthylation et de 11,4 p. 100 après. C'est une protéine riche en proline et acide glutamique. Elle ne contient pas de lysine et fort peu de glycine.

Méthyl - Caséine.

Cette protéine est obtenue par méthylation de la caséine extraite du lait selon la technique suivante :

On précipite la caséine par une solution d'acide chlorhydrique 0,05 N et addition d'alcool à 96° volume à volume. Après agitation, le précipité est isolé et remis en suspension dans de l'alcool, agité encore et laissé au repos jusqu'au lendemain. Après isolement, le précipité est lavé trois fois à l'éther sec, pulvérisé, desséché.

La caséine est un phosphoprotéide, l'acide phosphorique estérifiant les amino-acides alcools. C'est un corps acide insoluble dans l'eau et les acides, soluble dans les alcalis où elle donne des sels. Elle contient 0,7 p. 100 de phosphore qui paraît être estérifié par la sérine, la thréonine, l'hydroxyllysine ou l'acide hydroxyglutamique (POSTERNAK (17).

La méthylcaséine est une poudre blanchâtre soluble dans l'eau, contenant une part plus faible d'azote que la protéine naturelle (12,9 au lieu de 14,9 g. p. 100). Le point isoélectrique remonte dans l'échelle des pH vers l'alcalinité et se situe aux environs de 5.

OBJET DU TRAVAIL

Avant de passer à l'exposé des protocoles de nos expériences et de nos résultats nous préciserons le but de notre travail.

En bref, nous avons eu essentiellement pour objet d'étudier le rôle que pouvaient jouer le lysozyme, les protamines, la globine et les dérivés per-méthylés de la globine, de la caséine, de l'édestine et de la zéine au cours des phénomènes biologiques suivants :

la coagulation sanguine
la vitesse de sédimentation
les réactions d'hémagglutination

Cela trace le plan de l'exposé de nos recherches personnelles, plan que nous nous sommes efforcés de suivre dans la mesure où l'expérimentation était possible.

RECHERCHES PERSONNELLES

A. — LE LYSOZYME

1 — Rôle du lysozyme dans la vitesse de sédimentation

Nous avons voulu étudier l'influence du lysozyme injecté par voie intraveineuse chez le lapin, sur la vitesse de sédimentation.

L'expérimentation qui porte sur sept animaux a été conduite de la façon suivante :

Pour chaque animal, d'un poids moyen de 2 kg. à 2,500 kg., nous déterminons avant tout traitement, la vitesse de sédimentation à l'aide de la microméthode de KOWARSKI.

Le prélèvement est effectué sur une grosse goutte de sang obtenue par scarification au niveau de la veine marginale de l'oreille. La pipette graduée qui sert à ce prélèvement est rincée au préalable avec une solution de citrate de soude à 8 p. 100, 0,08 ml de citrate est refoulé au fond d'un petit godet conique, 0,2 ml de sang est alors mélangé très soigneusement avec la solution de citrate par aspirations et refoulements successifs. On prélève le sang citraté avec le microtube à sédimentation.

On détermine d'abord la vitesse de sédimentation de l'animal normal.

On injecte ensuite par voie intraveineuse 25 mg de lysozyme dissous dans 1 ml d'eau physiologique.

Une première expérience a été réalisée en vue de déterminer le délai optimum d'accélération de la sédimentation.

A cet effet ,des prélèvements ont été effectués, 2 heures, 4 heures et 5 heures après l'injection de lysozyme. La lecture est effectuée au bout de 1 heure, 2 heures, 3 heures, 4 heures et 24 heures.

Les résultats de ces essais préliminaires sont consignés dans le tableau n° 1.

TABLEAU I

Variations de la vitesse de sédimentation avant injection de lysozyme et 2 heures, 4 heures, 6 heures après

V. S.	Lecture de la sédimentation au bout de				
	1 h.	2 h.	3 h.	4 h.	24 h.
Avant lysozyme	1,5 mm	—	2 mm	2 mm	17 mm
2 heures après	2 mm	2,5 mm	2,5 mm	2,5 mm	17,5 mm
4 heures après	5 mm	10 mm	14 mm	—	108 mm
6 heures après	2 mm	—	—	—	55 mm

Il ressort de cette expérience :

1° que l'effet optimum du lysozyme paraît se situer quatre heures après l'injection de cette substance ;

2° que la vitesse de sédimentation est faible pendant les premières heures et pratiquement illisible.

Dans nos expériences ultérieures nous avons donc déterminé ic vitesse de sédimentation 4 heures après injection de la substance et mesuré cette sédimentation au bout de 24 heures.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau n° 2.

TABLEAU II

Variations de la vitesse de sédimentation avant injection de lysozyme et 4 heures après

Lapins N°	V.S. avant lysozyme lecture 24 h. après	V.S. 4 h. après lysozyme lecture 24 h. après
1	17 mm	108 mm
2	20 mm	90 mm
3	53 mm	78 mm
4	17 mm	30 mm
5	30 mm	75 mm
6	71 mm	90 mm
7	49 mm	110 mm

Nous pouvons donc observer :

1° que la vitesse de sédimentation de lapins considérés comme normaux est essentiellement variable ;

2° que cependant dans tous les cas l'injection de lysozyme à la dose de 25 mg augmente d'une façon notable la vitesse de sédimentation des hématies.

Cette accélération est d'autant plus nette, en général que la vitesse de sédimentation primitive est basse.

2. — Rôle du lysozyme dans l'hémagglutination

Nous avons noté lors de l'étude des propriétés générales du lysozyme, le fait qu'en tant que substance basique cet enzyme était attiré par les charges négatives de surface des corps microbiens.

Il nous a paru intéressant d'utiliser non plus des cellules microbiennes mais des hématies dont la surface est électro-négative ; nous avons ainsi mis en évidence la propriété hémagglutinante du lysozyme.

Pour toutes nos expériences nous nous sommes servis du lysozyme extrait du blanc d'œuf, lyophylisé et conservé en ampoules scellées.

La limite d'hémagglutination a été étudiée en présence d'une suspension de globules rouges de poule à 1 p. 100 et 1,5 p. 100, de mouton à 1 p. 100 et de globules rouges humains O Rh+, A Rh—, A_1 Rh+ à 1 p. 100.

L'expérimentation est conduite de la façon suivante :

On prépare une solution mère de lysozyme à 1 p. 100 dans de l'eau physiologique tamponnée.

La suspension de globules rouges est obtenue par ajout d'une quantité déterminée de sérum physiologique à des globules rouges prélevés sur citrate de soude et lavés trois à quatre fois par centrifugation avec de l'eau physiologique tamponnée.

La réaction d'hémagglutination que nous allons décrire est basée sur le principe des dilutions croissantes de 2 en 2.

On prélève 1 ml de solution mère de lysozyme que l'on porte dans le premier tube d'une gamme de 7 tubes à hémolyse. Dans les 6 autres tubes on dispose 0,5 ml d'eau physiologique tamponnée. On prend alors 0,5 ml de la solution mère contenue dans le tube n° 1 et on le porte dans le tube n° 2. Après avoir soigneusement mélangé le lysozyme et l'eau physiologique du tube n° 2 on effectue un prélèvement de 0,5 ml que l'on porte dans le tube n° 3 et ainsi de suite en ayant soin, lors du dernier mélange dans le tube n° 7, de rejeter 0,5 ml.

On ajoute ensuite dans chaque tube 0,5 ml de la suspension de globules rouges à étudier. On agite. La lecture est faite, après un laps de temps de deux heures où les tubes sont laissés à la température du laboratoire.

D'autre part, pour déterminer de façon assez exacte les limites de concentration provoquant l'agglutination des hématies, nous avons effectué des dilutions intermédiaires entre la dernière provoquant l'hémagglutination et la suivante ne la provoquant pas.

Le tableau n° 3 résume le protocole général suivi :

TABLEAU III

Réaction d'hémagglutination : Protocole général

Eléments de la réaction	1	2	3	4	5	6	7
Solution lysozyme 1 p. 100	1 ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Eau physiologique		0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Suspension G. R.	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Dilutions finales	1/200	1/400	1/800	1/1.600	1/3.200	1/6.400	1/12.800

Dans le tableau n° 4 nous avons rassemblé les résultats obtenus au cours de divers essais lors de la mise en contact d'une solution de lysozyme à 1 p. 100 préparée le jour même ou conservée plusieurs jours au réfrigérateur avec une suspension de globules rouges de mouton ou de poule à 1,5 p. 100.

TABLEAU IV

Hémagglutination des hématies de poule ou de mouton à 1,5 p. par une solution de lysozyme de préparation différente

Essai N°	Taux d'hémagglutination		Remarques concernant la solution de lysozyme
	Mouton	Poule	
1		1/2000	Préparée le même jour
2		1/400	Préparée le même jour
3		1/400	Préparée le même jour
4		1/800	Préparée le même jour
5	1/2000	1/5500	Conservées 5 j. à + 4° C
6		> 1/800 < 1/900	Premier jour
7		> 1/800 < 1/900	Conservé 24 h. à + 4° C
8		1/900	Conservé 48 h. à + 4° C
9		1/1000	Conservé 3 j. à + 4° C
10		> 1/800 < 1/900	Conservé 4 j. à + 4° C
11		1/800	Conservé 8 j. à + 4° C

Même échantillon

Nous avons étudié également l'hémagglutination d'une suspension de globules rouges de poule à 1 p. 100 par une solution de lysozyme ayant perdu son pouvoir enzymatique. Pour cela 2 ml de solution de lysozyme à 1 p. 100 additionnés de 0,1 ml d'acide chlorhydrique au 1/10 sont chauffés pendant 20 minutes à 80° au bain-marie. Après refroidissement cette liqueur est neutralisée avec de la soude au 1/10.

Un essai comparatif est fait avec du lysozyme frais du même échantillon. Les résultats sont les suivants :

TABLEAU V

Hémagglutination des hématies de poule à 1 % avec le lysozyme chauffé
Essai comparatif avec le lysozyme non chauffé

Lysozyme non chauffé	1/400
Lysozyme chauffé	1/1400

Les taux d'hémagglutination limites de suspension des globules rouges humains à 1 p. 100 par une solution de lysozyme sont rassemblés dans le tableau n° 6.

TABLEAU VI

Hémagglutination des hématies humaines à 1 % par le lysozyme

	Suspensions à 1 % des globules rouges des groupes		
	O Rh+	**A Rh —**	**A_1 Rh+**
Dilutions limites de lysozyme provoquant l'hémagglutination	1/800	> 1/200 < 1/400	1/400

A la suite de ces expériences on peut formuler les observations suivantes :

1° qu'il s'agisse d'hématies de poule, de mouton ou humaines, nous avons observé dans tous les cas une agglutination nette à des taux variables mais sans qu'il soit possible d'invoquer une spécificité ;

2° les expériences ayant été effectuées à plusieurs reprises avec des échantillons de lysozyme différents, mais de même provenance, nous avons pu constater des variations dans le taux limite d'hémagglutination des globules rouges d'une même espèce ;

3° la variabilité du taux d'hémagglutination observée au cours des essais pour une même espèce de globules rouges en présence d'une solution de lysozyme d'un même échantillon paraît en rapport avec la conservation de cette solution et dans une certaine mesure fonction de son vieillissement. Le maximum d'activité paraît se situer après 3 jours de conservation au réfrigérateur à + 4° ;

4° Le chauffage du lysozyme en milieu chlorhydrique faible, destiné à détruire ou inhiber son pouvoir enzymatique, augmente nettement son activité hémagglutinante vis-à-vis des globules rouges de poule.

B. — PROTAMINE, GLOBINE ET METHYL-PROTEINES

Rôle des protamines dans l'hémagglutination

La solution de protamine utilisée est une solution de sulfate de protamine à 1 p. 100 en ampoules destinées à l'injection intraveineuse, fabriquées par les laboratoires CHOAY.

Les globules rouges sont recueillis et traités de la même façon que celle décrite dans le chapitre du lysozyme. Les suspensions sont à 1,5 p. 100 pour les globules rouges de poule et de mouton, et à 1 p. 100 pour les globules rouges humains.

Le mode opératoire a été précédemment décrit. Les résultats sont rassemblés dans le tableau n° 7.

TABLEAU VII

Hémagglutination des globules rouges de poule et de mouton à 1,5 % et humains à 1 % par le sulfate de protamine

Suspension de globules rouges		Taux d'hémagglutination limite
Poule		1/800.000
Mouton		1/250.000
Humains	O Rh +	1/400.000
	A Rh —	1/400.000
	A_1 Rh +	> 1/350.000 < 1/400.000

A la suite de ces expériences on peut constater que le sulfate de protamine possède un très fort pouvoir hémagglutinant, ce que justifie un point isoélectrique situé à un pH qui fait des protamines, des bases fortes (pH 10 à 12).

Rôle de la globine dans l'hémagglutination

On prépare une solution mère de globine à 1 p. 100 dans de l'eau physiologique tamponnée Le tampon peut être indifféremment du phosphate dissodique à 0,1 g. p. 1.000 ou le tampon véronal. L'emploi d'une eau physiologique non tamponnée provoque une hémolyse des globules rouges de la suspension. Ce fait est dû au caractère acide de l'eau distillée employée, bien qu'elle soit bidistillée sur pyrex.

Les suspensions de globules rouges sont de deux concentrations différentes :

— globules rouges de poule et de mouton à 1,5 p. 100 ;

— globules rouges de poule et humains à 1 p. 100.
Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau n° 8.

TABLEAU VIII

Hémagglutination par la globine des hématies de poule de mouton et humaines

Concentration globules rouges	Suspension de globules rouges	Taux d'hémagglutination
1,5 p. 100	Poule	1/3.500
1,5 p. 100	Mouton	1/13.000
1 p. 100	Poule	1/7.500
1 p. 100	O Rh +	1/12.800
1 p. 100	A Rh —	1/12.800
1 p. 100	A_1 Rh +	1/12.800

La globine, protéine à point isoélectrique basique possède elle aussi un pouvoir hémagglutinant assez marqué, plus marqué que celui du lysozyme, mais moins que celui des protamines.

D'autre part, ce qui paraît d'ailleurs assez logique, la concentration de la suspension en globules rouges influence le taux limite d'hémagglutination. Celui-ci est d'autant plus élevé que la concentration en hématies est plus faible.

METHYL-GLOBINE

De par ses propriétés basiques analogues à celles du lysozyme, nous pouvons penser qu'à l'égal de cet enzyme, la méthyl-globine est susceptible de jouer un rôle dans la coagulation, la vitesse de sédimentation, l'hémagglutination.

I. — Rôle de la méthyl-globine dans la coagulation

Nous avons tout d'abord vérifié que la méthyl-globine et l'héparine étaient susceptibles de se combiner *in vitro* afin de donner un précipité.

Pour cela une solution de méthyl-globine est additionnée à pH = 7 à une solution d'héparine. On observe la formation d'un composé insoluble, moins important toutefois que dans le cas du lysozyme.

Cependant la combinaison entre les deux produits existant, nous allons procéder à nos essais in vivo. Ceci nous a amené à réaliser une série d'expériences afin de chercher si la méthyl-globine peut être utilisée comme antidote de l'héparine.

Solutions utilisées :

1° **Solution d'héparine.**

Nous avons utilisé une solution d'héparine commerciale : liquemine Roche titrant 50 mg d'héparine au ml.

2° **Solution de méthyl-globine.**

La méthyl-globine a été préparée à partir de la globine selon le procédé décrit par M. JOURDAN (11). Nous avons réalisé une solution de cette substance à raison d'environ 30 mg par ml dans l'eau physiologique. Le pH de cette liqueur a été ajusté à pH = 7 à l'aide de quelques gouttes de solution normale de soude. Nous avons dosé l'azote protidique de cette solution par microkjeldahl après minéralisation sulfurique. Ceci nous a permis de calculer la quantité exacte de substance dissoute sachant que la méthyl-globine utilisée contient pour 100 mg 11,5 mg d'azote.

3° Les temps de coagulation du sang des animaux ont été déterminés à l'aide de la technique photométrique de P. MEUNIER et A. DREYFUS (13), qui nécessite les réactifs suivants :

— solution de citrate de sodium 0,25 M (9 p. 100 du sel cristallisé à 5,5 H_2O) ;
— solution de chlorure de calcium 0,1 M (sel anhydre à 1,11 p. 100) ;
— eau physiologique chlorure de sodium à 8,5 g. p. 1.000.

Le mode opératoire est le suivant :

Après ponction veineuse ou cardiaque, le sang est recueilli dans un tube à essais gradué contenant autant de gouttes de citrate que de ml de sang. L'aiguille du prélèvement doit être rincée au citrate. On agite et on centrifuge pendant 5 minutes à 4.000 tours. Le plasma est recueilli à la pipette et conservé en tube bouché à + 4°.

Par ailleurs on mélange dans la cuve propre et sèche d'un photomètre, 1 ml de plasma citraté avec 4 ml de la solution de chlorure de calcium dans l'eau physiologique (0,25 ml pour 3,75). On mesure l'absorption avec l'écran orangé à des intervalles réguliers.

Pendant une certaine période dite, temps de latence, t, l'opacité du mélange demeure la même puis croît jusqu'à la coagulation complète. La lecture est terminée lorsque l'on trouve plusieurs valeurs égales.

On construit une courbe en portant en abscisse le temps et en ordonnées les opacités successives exprimées par la graduation du tampon de l'appareil. On obtient une courbe composée d'une branche à peu près horizontale qui représente la phase de latence, t, et où il n'y a pas encore apparition de fibrine. Puis d'une branche ascendante dès l'apparition de fibrine rapidement bornée à la forme d'un S. Soit T, la durée totale de la précipitation de la fibrine du plasma. Les valeurs t et T sont déterminées par extrapolation graphique.

Action des injections de méthyl-globine sur le chien hépariné

L'expérience a porté sur trois chiens (de 7 à 17 kg) sur lesquels nous avons pratiqué une injection intraveineuse d'héparine (6,5 mg par kg d'animal). Nous avons vérifié que l'action de l'anticoagulant se poursuivait de 6 à 12 heures.

Nous avons injecté de la méthyl-globine (16 mg p. kg d'animal), 30 mn après l'injection d'héparine. A des intervalles réguliers nous avons déterminé le temps de coagulation du sang après l'injection de méthyl-globine.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau n° 9.

TABLEAU IX

Variations des temps (t) et (T) des thrombo-grammes de MEUNIER sous l'action de la méthylglobine injectée à un chien hépariné

Chiens N°	des prélèvements sanguins (en mn)	Temps en minutes	
		t	T
1	0 (H)	4 mn 30 s	7 mn 30 s
	30 (M.G.)	Sang incoagulable	
	120	Sang incoagulable	
	210	2 mn 30 s	12 mn 30 s
	255	9 mn 30 s	19 mn 30 s
2	0 (H)	10 mn	17 mn 30 s
	30 (M.G.)	Sang incoagulable	
	120	Sang incoagulable	
	210	4 mn	6 mn 30 s
3	0 (H)	8 mn	11 mn 30 s
	30 (M.G.)	Sang incoagulable	
	150	8 mn	18 mn 30 s
	210	17 mn	35 mn

L'examen de ce tableau montre que la méthyl-globine ramène le temps de coagulation du sang d'animaux héparinés, au voisinage de sa valeur initiale entre 2 h. et 2 h. 30. Nous rappelons que le lysozyme dans le même cas avait une action beaucoup plus rapide puisqu'il ramenait le temps de coagulation du sang à sa valeur normale entre 30 mn et 1 heure.

II. — Rôle de la méthyl-globine dans la vitesse de sédimentation

Cette expérience a été pratiquée sur des lapins de la même façon qu'avec le lysozyme.

Dans un premier temps nous avons recherché le délai optimum d'action de la méthyl-globine sur l'accélération de la vitesse de sédimentation.

La concentration de la substance injectée est du même ordre que celle du lysozyme, soit 25 mg sous le volume de 1 ml.

Dans le tableau n° 10, nous avons rassemblé les résultats de l'expérience préliminaire effectuée sur le lapin n° 1.

TABLEAU X

Variations de la vitesse de sédimentation chez le lapin n° 1 avant et après injection de méthyl-globine

V. S.	Lecture de la sédimentation au bout de				
	1 h.	2 h.	3 h.	4 h.	24 h.
Avant méthyl-glob. ..	2 mm	3 mm	—	6 mm	31 mm
2 heures après	—	4 mm	5 mm	8 mm	45 mm
4 heures après	3,5 mm	6 mm	8 mm	9 mm	45 mm
6 heures après	2.5 mm	4 mm	8 mm	—	56 mm

La méthyl-globine accélère donc bien la vitesse de sédimentation mais dans un temps plus long que pour le lysozyme puisque le maximum d'action paraît se situer 6 heures après l'injection de méthyl-globine .. (nous rappelons que celui du lysozyme était placé à 4 heures après).

Une deuxième expérience de vérification a donc été pratiquée de la même façon que la première. Les résultats sont consignés dans le tableau n° 11.

TABLEAU XI

Variations de la vitesse de sédimentation chez le lapin n° 2 avant et après injection de méthyl-globine

V. S.	Lecture de la sédimentation au bout de				
	1 h.	2 h.	3 h.	4 h.	24 h.
Avant méthyl-glob. ..	2 mm	3 mm	—	5 mm	30 mm
2 heures après	—	4 mm	6 mm	8 mm	40 mm
4 heures après	3 mm	5 mm	7 mm	9 mm	40 mm
6 heures après	2 5 mm	4 mm	—	—	80 mm

Dans un troisième essai identique, effectué 48 heures apres le précédent et avec les mêmes animaux, les résultats ont été les suivants :

TABLEAU XII

Variations de la vitesse de sédimentation chez les lapins n°s 1 et 2 48 heures après une injection de méthyl-globine et 6 heures après une nouvelle injection

Lapins N°	Vitesse de sédimentation avant méthyl-globine Lecture 24 h. après	Vitesse de sédimentation 6 h. après méthyl-globine Lecture 24 h. après
1	48	102
2	65	85

Nous pouvons remarquer que :

1° lors des expériences préliminaires la sédimentation présente chez les deux lapins traités, une varation à peu près constante d'heure en heure, plus nette que pour le lysozyme.

2° dans tous les cas, la méthyl-globine, à la dose de 25 mg sous un volume de 1 ml, accélère la vitesse de sédimentation des hématies.

3° la valeur de l'accélération se situe entre 30 et 50 mm. alors que pour le lysozyme elle était variable et pouvait donner de très grands écarts.

4 le dernier essai semble montrer une persistance de l'action de la méthyl-globine sur l'acélération de la vitesse de sédimentation puisque les deux animaux, 48 heures après l'injection de méthyl-globine, présentent encore une sédimentation accélérée par rapport à la vitesse de sédimentation normale déterminée avant tout traitement.

III. — Rôle de la méthyl-globine dans l'hémagglutination

On prépare une solution mère à 1 p. 100 de méthyl-globine. Des dilutions croissantes et convenablement choisies sous le volume de 0,5 ml sont introduites dans une série de tubes à hémolyse et additionnées de 0,5 ml de suspension de globules rouges à 1,5 p. 100.

Nous avons étudié successivement les globules rouges de poule, puis de mouton. Les résultats ont été rassemblés dans le tableau n° 13.

TABLEAU XIII

Hémagglutination par la méthyl-globine des globules rouges de poule et de mouton

G. R. à 1,5 %	Concentrations en méthyl-globine								
	1/200	1/400	1/500	1/600	1/700	1/750	1/800	1/950	1/1000
Poule	++	++	++	+	+	+	—	—	—
Mouton ..	++	++	++	++	++	++	+	+	—

Le taux limite d'hémagglutination d'une suspension de globules rouges de poule à 1,5 p. 100 est donc de 1/750 tandis qu'il est de 1/950 vis-à-vis de la suspension de globules rouges de mouton.

Nous pouvons remarquer que la méthyl-globine ne possède plus le pouvoir hémagglutinant de la protéine non méthylée, qu'il est bien moins fort et se situe approximativement dans les limites observées pour le lysozyme.

Méthyl-Edestine, Méthyl-Zeine, Méthyl-Caséine leur rôle dans l'hémagglutination

L'action de ces trois méthyl-protéines a été étudiée vis-à-vis de suspensions de globules rouges de poule et de mouton à 1,5 p. 100.

On part chaque fois d'une solution mère de méthyl-protéine étudiée à 1 p. 100 dans l'eau physiologique tamponnée

METHYL-EDESTINE

TABLEAU XIV

Hémagglutination de suspensions à 1,5 % de globules rouges de poule et de mouton par la méthyl-édestine

G. R. à 1,5 %	Concentrations en méthyl-édestine								
	1/200	1/400	1/800	1/1000	1/2000	1/3000	1/4000	1/5000	1/5500
Poule	++	++	++	++	++	++	+	—	—
Mouton ..	++	++	++	++	++	++	++	+	—

TABLEAU XV

Hémagglutination des globules rouges de poule et de mouton par la méthyl-zéine et la méthyl-caséine

Méthyl-protéine	Concentrations en méthyl-protéine					
	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400
Méthyl-zéine	— (hémolyse +)*	— (hémolyse +)*	— (hémolyse +)*	—	—	—
Méthyl-caséine	— (hémolyse +)*	— (hémolyse +)*	— (hémolyse +)*	— (hémolyse +)*	—	—

* Malgré l'hémolyse, nous avons pu constater que les stromas globulaires étaient sédimentés en « pastille » et ne présentaient donc pas l'aspect d'une hémagglutination.

Ces résultats sont les mêmes quels que soient les globules rouges employés (poule et mouton).

La méthyl-zéine présente une hémolyse nette dans les trois premiers tubes, de la suspension de globules rouges. A partir du quatrième tube nous n'observons ni hémolyse ni hémagglutination.

La méthyl-caséine réagit à peu près de la même façon avec une hémolyse incomplète pour les concentrations du 1/800 et du 1/1600.

Ces trois méthyl-protéines présentent donc des propriétés hémagglutinantes différentes. Si la méthyl-édestine possède un pouvoir hémagglutinant marqué, la méthyl-zéine et la méthyl-caséine en sont totalement dépourvues.

CONCLUSIONS

Arrivée au terme de nos recherches, il convient de discuter nos résultats expérimentaux et de tenter d'en tirer les conclusions.

Nous avons vu, au cours de notre introduction que le point de départ de notre travail a consisté à poursuivre des recherches sur les propriétés biologiques du lysozyme. Ainsi nous sommes engagés dans la même voie que VIOLLE, DUMAZERT et Coll. qui ont mis en évidence le pouvoir coagulant du lysozyme *in vivo*. Cet enzyme agit au cours de la coagulation sanguine comme un antagoniste de l'héparine et les auteurs précédemment cités ont démontré que cet antagonisme résulte de l'affinité de l'héparine, de caractère acide, pour le lysozyme protéine aux propriétés nettement basiques.

Aussi dans la première partie de notre travail, nous sommes-nous proposés de rechercher l'influence des charges positives apportées par le lysozyme sur deux autres phénomènes : la vitesse de sédimentation des hématies et l'hémagglutination, qui sont tous les deux, en grande partie, sous la dépendance des charges électriques.

En ce qui concerne nos recherches relatives à l'étude de l'action du lysozyme sur la vitesse de sédimentation, nous voyons en examinant nos résultats résumés dans le tableau n° 2 (voir page 38) que l'injection de lysozyme (25 mg.) au lapin, a pour effet d'augmenter la vitesse de sédimentation. Le phénomène s'observe très nettement sur des prélèvements de sang effectués quatre heures après l'injection de lysozyme : dans les conditions expérimentales nous avons pu observer que les vitesses de sédimentation peuvent être ainsi au moins doublées et même sextuplées par rapport à la vitesse de sédimentation du sang

prélevé chez le même animal avant l'injection de lysozyme. Il est à noter que, en règle générale, les variations sont d'autant plus importantes que la vitesse de sédimentation initiale est plus basse.

Nos recherches relatives au rôle du lysozyme dans les réactions d'hémagglutination se sont également révélées positives. En effet, nous avons montré que des solutions diluées de lysozyme chauffées ou non provoquent toujours une agglutination très nette des suspensions d'hématies quelle que soit l'origine zoologique de ces dernières on ne saurait donc invoquer ni une action enzymatique ni un caractère spécifique. Les taux d'agglutination ont été toujours notés. Ils nous ont paru assez variables puisque nous pouvons relever dans nos résultats des taux s'étalant de 1/2000 à 1/4000, exceptionnellement au 1/5 500. Nous pensons que ces écarts considérables sont à rapporter surtout au vieillissement des solutions de lysozyme plutôt qu'à tout autre facteur. En effet, ce sont les solutions conservées pendant les temps les plus longs au réfrigérateur, ainsi que celles qui ont été chauffées, qui nous ont fourni, en général, les taux d'agglutination les plus élevés.

En résumé, il nous paraît intéressant, de considérer maintenant, ces trois propriétés biologiques du lysozyme, mises en évidence au laboratoire, à savoir :

a) le lysozyme est un antihéparinique, ce qui explique parfaitement, sinon complètement que ses injections raccourcissent le temps de coagulation ;

b) le lysozyme injecté, provoque une nette accélération de la vitesse de sédimentation ;

c) le lysozyme *in vitro*, donne lieu à de très sensibles réactions d'hémagglutination non spécifiques.

A partir de ces faits bien établis par l'expérience, il est permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle ils pourraient admettre comme cause commune et principale le caractère alcalin du lysozyme. Si tel est le cas on doit pouvoir apporter une contribution à la vérification de cette interprétation en démontrant que les trois propriétés énumérées ci-dessus sont également celles d'autres protéines possédant un point isoélectrique élevé, proche de celui du lysozyme. En contre-partie des protéines de point isoélectrique situé dans la gamme acide des pH, devraient se montrer inactives dans la coagulation, la vitesse de sédimentation, lorsque l'on considère ces phénomènes en dehors de toute intervention de nature enzymatique ou mettant en cause des facteurs sérologiques spécifiques ; on sait qu'il en est bien ainsi pour la sérum-albumine, par exemple. Ces considérations justifient les recherches que nous avons poursuivies dans la seconde partie de notre travail et dont les résultats peuvent être résumés de la façon suivante :

Voyons tout d'abord les résultats acquis lors de la mise en

œuvre de protéines de caractère alcalin, à savoir les protamines, la globine et la méthylglobine. Nous avons établi que les protamines présentent un très fort pouvoir hémagglutinant (taux d'hémagglutination limite observés entre 1/350.000 et 1/800.000). On sait par ailleurs que leur propriété anti-héparinique est très caractéristique. Nous n'avons pas étudié leur rôle dans la vitesse de sédimentation.

En ce qui concerne la globine nos résultats font ressortir que cette protéine utilisée sous une forme dénaturée (son pH est alors voisin de 8,2) possède un pouvoir hémagglutinant assez marqué ; les taux d'agglutination que nous avons observés oscillent entre 1/3500 et 1/12.800. La globine est donc plus hémagglutinante que le lysozyme, mais beaucoup moins que les protamines. La globine n'a pas été étudiée en ce qui concerne son rôle éventuel sur la coagulation sanguine et la vitesse de sédimentation des hématies.

Par contre nous avons poursuivi nos recherches sur diverses protéines perméthylées. En particulier la perméthyl-globine s'est révélée présenter des actions comparables à celles du lysozyme sur la coagulation du sang, la vitesse de sédimentation et au cours des réactions d'hémagglutination. Pour préciser, rappelons que la méthyl-globine injectée à des chiens héparinés ramène le temps de coagulation du sang de ces animaux à sa valeur initiale au bout d'environ deux heures. Comparativement le lysozyme aurait une action plus rapide, puisqu'elle est manifeste au bout de la première heure consécutive à son injection.

L'action de la méthyl-globine sur la vitesse de sédimentation du sang de lapin est très analogue à celle du lysozyme. Les comparaisons sont ici difficiles en raison des grandes variations des vitesses de sédimentation que nous avons toujours observées chez les lapins normaux, utilisés comme témoin. Nous pensons cependant intéressant de souligner la persistance pendant au moins quarante-huit heures de l'accélération de la vitesse de sédimentation provoquée par les injections de méthyl-globine.

En ce qui concerne le pouvoir hémagglutinant de la méthyl-globine, nous avons signalé qu'il subsiste consécutivement à la méthylation, mais il y a lieu de signaler qu'il est nettement inférieur à celui de la globine non méthylée. En effet, alors que la globine, conduit couramment à des taux d'hémagglutination de l'ordre du 1/10.000, pour la méthyl-globine nous n'avons observé que des taux de 1/750 à 1/950. En cela la méthyl-globine est à rapprocher du lysozyme dont le pouvoir hémagglutinant n'est pas des plus élevés.

Notre expérimentation sur la méthyl-globine, particulièrement complète nous permet donc de mettre en évidence que cette substance partage avec le lysozyme des actions pratiquement

identiques sur les trois phénomènes que nous avons étudiés : la coagulation, la vitesse de sédimentation et les réactions d'hémagglutination. Or, le lysozyme et la perméthyl-globine sont deux substances protéidiques de caractère nettement alcalin, donc capables d'introduire dans les milieux biologiques des charges électriques positives qui, conformément à notre hypothèse, seraient la cause des faits que nous avons observés.

Nous pensons qu'il faut voir là, non une démonstration mais un argument valable, de nature à inciter les physico-chimistes à tenter de vérifier notre hypothèse

Enfin ces expériences effectuées avec la méthyl-globine nous ont conduit à étudier d'autres méthyl-protéines telles que la méthyl-édestine, la méthyl-zéine et la méthyl-caséine en ce qui concerne leur participation aux réactions d'hémagglutination. Une telle étude ne pouvait pas être effectuée avec les protéines natives : édestine, caséine et zéine en raison de leur insolubilité dans l'eau. Par contre leur dérivé méthylé est soluble et M. JOURDAN a montré dans le cas de la caséine en particulier, que la méthylation déplaçait sensiblement leur point isoélectrique vers la zone alcaline des pH sans toutefois les transformer en substance de caractère nettement alcalin ; bien au contraire, pour la méthyl-caséine, le pHi demeure nettement inférieur à 7 (soit pHi = 5,2 alors que pour la caséine on a pHi = 4,75). Nos résultats s'accordent pour refuser à la méthyl-zéine et à la méthyl-caséine tout pouvoir hémagglutinant.

Le cas de la méthyl-édestine nous paraît devoir être l'objet d'une discussion particulièrement intéressante. En effet, nos résultats nous conduisent à lui attribuer un pouvoir hémagglutinant nettement marqué puisque le taux limite d'hémagglutination est de l'ordre de 1/5.000. Or l'édestine est une protéine végétale remarquable par sa richesse en acides diaminés, soit : arginine, 14,3 ; histidine, 2,5 et lysine 2,3 % (valeurs calculées pour 16 % d'azote). Comparons avec la composition en diamino-acide de la zéine soit : arginine, 1,8 ; histidine, 1,7 et lysine, 0,0. Il nous est facile de concevoir pourquoi l'édestine possède un point isoélectrique peu différent de 6, assez élevé pour une protéine végétale. Rappelons que le point isoélectrique de la caséine n'est que : pHi = 4,75 et que la méthylation l'élève aux environs de pHi = 5,2. Dès lors nous pouvons en inférer que la méthylation de l'édestine est susceptible d'élever le point isoélectrique à une valeur au moins égale à pH = 7. Ainsi la méthyl-édestine tend-elle à entrer dans le groupe des protéines de caractère basique, ce qui s'accorde avec les propriétés hémagglutinantes que nous lui avons trouvées. Tel ne saurait être le cas de la zéine dépourvue de lysine et, par ailleurs très pauvre en arginine et en histidine.

Dans l'ensemble les résultats de nos recherches nous permettent de poser, en matière de conclusion générale, l'hypothèse

selon laquelle les protéines de caractère basique sont douées de propriété antihéparinique, accélèrent la vitesse de sédimentation et provoquent l'hémagglutination du fait des charges positives qu'elles apportent dans les milieux biologiques considérés au cours de notre expérimentation.

LU et APPROUVE
Le Président du Jury :
C. DUMAZERT.

VU et APPROUVE
Pour le Doyen, l'Assesseur :
J. DELPHAUT.

VU et PERMIS D'IMPRIMER
AIX, le 9 juin 1958
Le Recteur : J. BLACHE

BIBLIOGRAPHIE

1. ACHER R., JUTISZ M., FROMAGEOT C. — « Biochim. Biophys. Acta. », 1950, **5**, 493-498.
2. ACHER R., JUTISZ M., FROMAGEOT C. — « Biochim. Biophys. Acta. », 1952, **8**, 442-449.
3. CORTESI R. — Thèse 1938, Paris.
4. DUMAZERT C. et GHIGLIONE C. — « Bull. Soc Chim. Biol. », 1953, **147**, 836-838.
5. DUMAZERT C. et GHIGLIONE C. — « Bull. Soc. Pharmacie de Marseille », 1956, **5**, 299-308.
6. FLORKIN M. — « Biochimie humaine », Maloine Ed., 1945, 64-68.
7. FROMAGEOT C., PRIVAT de GARILHE M. — « Biochim. Biophys. Acta. », 1950, **4**, 509-517.
8. FROMAGEOT C., SCHNECK G. — « Biochim. Biophys. Acta. », 1950, **6**, 113-122.
9. GHIGLIONE C. — Thèse 1953, Marseille.
10. GUILLST M. et FIEHRER A. — « Biologie Médicale », 1955, **44**, 641-659.
11. JOURDAN M. — Thèse 1956, Marseille.
12. LEBEAU et JANOT. — « Traité de Pharmacie Chimique », tome 5, 3672-3675.
13. MEUNIER P. et DREYFUS A. — « Bull. Soc. Chim. Biol. », 1940, **22**, 529-538.
14. PACE S. — In « Moderne Methoden der pflanzen analyse ».
15. PERUGINI S. — « Presse Médicale », avril 1957, 719-720.
16. POLONOVSKY M. et LESPAGNOL A. — « El Chim. Org. Biol. », Masson Ed., 1934, 419-426.
17. POLONOVSKY M. — « Eléments de Biochimie Médicale », Masson Ed., 1942, 478-480.
18. POLONOVSKY M. et GADJOS A. — « Exposés Annuels de Bioch. Médicale », 1945, **5**, 152-188.
19. PUTZEYS P. — « Exposés Annuels de Biochimie Médicale », 1950, **11**, 29-51.
20. SALTON M.-R. — « Proceedings of the Third International Congress of Biochemistry », 1955, 404-410.
21. SALTON M.-R. — « Bactériological Reviews. », 1957, vol. 21, n° 2, 82-96.
22. SOULIER J.-P. — « Presse Médicale », 27 juillet 1957, 1342-1346.
23. SOULIER J.-P. — « Presse Médicale », 17 août 1957, 1391-1394.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS 17

INTRODUCTION 19

A) Le lysozyme 19

B) Protamines, globine et quelques méthyl-protéines .. 28

OBJET DU TRAVAIL 35

RECHERCHES PERSONNELLES :

A) Lysozyme 37

1) Rôle dans la vitesse de sédimentation 37

2) Rôle dans l'hémagglutination 39

B) Protamines, globine et méthylprotéines :

Rôle des protamines dans l'hémagglutination 42

Rôle de la globine dans l'hémagglutination 42

Rôle de la méthyl-globine :

1) *Dans la coagulation* 43

2) *Dans la vitesse de sédimentation* 45

3) *Dans l'hémagglutination* 47

Rôle de la méthyl-édestine, de la méthyl-zéine et de la méthyl-caséine dans l'hémagglutination 48

CONCLUSIONS 51

BIBLIOGRAPHIE 57

IMPRIMERIE
LINO - IMP.
MARSEILLE
TÉL. : 77-92-48